·中药研究·

DOI:10.11656/j.issn.1673-9043.2026.07.05

花茵陈总黄酮提取纯化工艺优化及其抗氧化药效研究*

刘明珠[1],王雪媛[2],谭伟濠[1],孙禄福[1],张乃曼[2],李天祥[1]
(1.天津中医药大学,天津 301617;2.盛实百草药业有限公司,天津 300301)

摘要:[目的] 优化花茵陈总黄酮(TFHC)的提取纯化工艺,评价其体外抗氧化活性,为TFHC产业化制备与药理应用研究提供实验依据。**[方法]** 采用超声辅助热浸法,结合正交实验-响应面法优化TFHC提取工艺;通过6种大孔树脂(NKA-9、HPD-600、AB-8、DM-130、D-101、D-4020)筛选与动态纯化制备精制TFHC;采用高效液相色谱(HPLC)法、紫外分光光度法系统考察纯化产物的2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)自由基清除能力及对黄嘌呤氧化酶(XOD)的抑制能力。**[结果]** 优化筛选出TFHC最佳提取工艺参数:液料比51 mL/g、乙醇体积分数38.2%、超声时间30 min、热浸温度70 ℃及热浸时间1 h;静态吸附和解析能力较好的为D-101树脂;确定最佳纯化工艺为:上样浓度1.5 mg/mL,上样流速7 BV/h,树脂柱径高比1∶12,上样量2.35 BV,除杂洗脱液用量2.94 BV,洗脱剂70%乙醇,洗脱流速10.6 BV/h,洗脱剂用量2.35 BV。经最佳纯化工艺处理后,TFHC纯度由38.33%上升至92.00%,纯化效果明显。纯化后的TFHC对XOD的半数抑制浓度(IC_{50})由5.061 mg/mL下降至1.905 mg/mL,其对DPPH自由基清除能力的IC_{50}值由0.070 mg/mL下降至0.033 mg/mL。**[结论]** TFHC最佳提取纯化工艺显著提升其得率与纯度,纯化后产物体外DPPH自由基清除能力及XOD抑制能力增强,抗氧化活性显著。

关键词:茵陈;总黄酮;大孔吸附树脂;黄嘌呤氧化酶;抗氧化
中图分类号:R284 **文献标志码:**A
文章编号:1673-9043(2026)07-0789-10

茵陈为菊科植物滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. 或茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分[1],具有清利湿热、利胆退黄之功效[2]。现代研究表明,其药理作用主要与富含的黄酮类成分有关,该类成分通过抗氧化机制干预炎症、代谢异常等病理过程[3-4],是天然产物研究热点之一。

茵陈的药效物质基础受采收期影响显著,春季采收为"绵茵陈",秋季采收为"花茵陈",故而有"三月茵陈四月蒿"之说[5-6]。花茵陈于植物生长末期采收,次生代谢产物积累更加充分,黄酮类成分含量更高,活性组分比例更优[7-8],是研究黄酮提取、纯化及活性评价的优质原料。大孔吸附树脂因其吸附容量大、选择性好、再生方便等优点[9-10],适用于茵陈黄酮类成分的富集与纯化[11-12]。

因此,本研究以花茵陈为原料,采用正交实验-响应面法优化花茵陈总黄酮(TFHC)提取工艺,并通过大孔吸附树脂技术优化其纯化参数,进一步通过2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)自由基清除实验及黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制实验,系统评价纯化后TFHC的体外抗氧化活性,为其产业化制备、药用开发及后续应用提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 JP-400B高速粉碎机(永康市久品工贸有限公司);SB25-12DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-ZK4二列四开水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);FA2104电子天平(上海舜宇恒平科技仪器有限公司);YHG-600-BS-Ⅱ远红外快速干燥箱(上海贺德实验设备有限公司);SHB-B95A循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有

*基金项目:中国工程院战略研究与咨询项目(2024-DFZD-28-01);国家中医药管理局全国老药工传承工作室建设项目(12000025P09CORJ);中央本级重大增减支项目(2060302)。
作者简介:刘明珠(2001-),女,硕士研究生在读,主要研究方向为中药分析与质量评价。
通信作者:李天祥,E-mail:litianxiang612@sina.com。
引用格式:刘明珠,王雪媛,谭伟濠,等.花茵陈总黄酮提取纯化工艺优化及其抗氧化药效研究[J].天津中医药大学学报,2026,45(7):789-798.

限公司);Series1500高效液相色谱(HPLC)仪(美国Alltech科技有限公司);UV-6100 PCS紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司)。

1.2 试剂 芦丁(批号:2550915009)、XOD(批号:324G011)、别嘌呤醇(批号:428A023)、尿酸(分析纯)均由北京索莱宝科技有限公司提供;硝酸铝(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、磷酸缓冲液(批号:C17958677)均由上海麦克林生化科技有限公司提供;黄嘌呤(批号:A23GS1558367)、蒽酮(分析纯)及大孔树脂(AB-8、DM-130、D-101、D-4020、NKA-9、HPD-600)均由上海源叶生物科技有限公司提供;D-无水葡萄糖(批号:RH429337)、DPPH试剂(批号:RH602062)、抗坏血酸(批号:RH387667)均由上海易恩化学技术有限公司提供;无水乙醇(分析纯,天津风船化学试剂科技有限公司);亚硝酸钠(分析纯,天津江天化工技术有限公司);甲醇(色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,天津市康科德科技有限公司);娃哈哈纯净水(天津娃哈哈食品有限公司);浓硫酸(分析纯,天津利安隆博华医药化学有限公司)。

1.3 材料 花茵陈地上部分(2024年9月采于天津中医药大学种质资源圃),经天津中医药大学李天祥教授鉴定为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb.。

2 实验方法

2.1 TFHC提取液制备 取花茵陈地上部分,置于通风处阴干,粉碎后过24目筛,得到花茵陈粉末。参考文献[13]提取方法并稍作修改,称取花茵陈粉末适量,加入乙醇溶液没过药材粉末,超声提取后转为热浸提取。

2.2 TFHC含量测定 参考文献[14]方法绘制标准曲线,得到回归方程为 Y=0.008 928X+0.003 093,r^2=0.999 6。取0.2 mL的TFHC提取液于10 mL容量瓶中,依次加入0.4 mL 5%亚硝酸钠溶液、0.4 mL 10%硝酸铝溶液及5 mL 4%氢氧化钠溶液,用40%乙醇定容,摇匀后静置6 min,以乙醇为空白对照,于510 nm波长下测定吸光度值(A)。利用标准曲线计算总黄酮浓度,按照公式计算总黄酮含量。

$$总黄酮含量(mg/g)=\frac{D\times V\times c}{M\times 10^3}。$$

式中 D 为样品溶液稀释倍数,V 为吸取样品溶液体积(mL),c 为样品溶液中总黄酮浓度(μg/mL),M 为样品溶液中所含茵陈质量(g)。

2.3 TFHC提取工艺优化

2.3.1 单因素实验 准确称取花茵陈粉末0.5 g,控制单因素变量,分别考察乙醇体积分数、料液比、超声时间、热浸时间及热浸温度对TFHC提取量的影响。乙醇体积分数分别为10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%,液料比分别为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 mL/g,超声时间分别为0、10、20、30、40、50 min,热浸时间分别为0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h,热浸温度分别为40、50、60、70、80 ℃。

2.3.2 正交实验 根据单因素实验结果,以液料比、乙醇体积分数、超声时间、热浸时间及热浸温度为考察因素,以TFHC提取量为评价指标,每个因素设计3个水平,建立 $L_{18}(3^5)$ 正交表进行实验,各因素及水平见表1。

表1 正交实验因素水平表

水平	因素				
	液料比(mL/g)	乙醇体积分数(%)	超声时间(min)	热浸时间(h)	热浸温度(℃)
1	40	30	10	0.5	50
2	50	40	20	1.0	60
3	60	50	30	1.5	70

2.3.3 Box-Behnken响应面法优化实验 在正交实验基础上,选取显著性影响因素液料比、乙醇体积分数及热浸时间为自变量,以TFHC提取量为响应值,设计三因素三水平响应面实验,并确定最佳提取工艺。实验因素及水平见表2。

表2 响应面实验因素及水平

水平	因素		
	液料比(mL/g)	乙醇体积分数(%)	热浸时间(h)
-1	40	30	0.5
0	50	40	1.0
1	60	50	1.5

2.4 TFHC纯化工艺优化

2.4.1 大孔树脂预处理 选取6种不同型号大孔吸附树脂(D-101、D-4020、AB-8、DM-130、NKA-9、HPD-600),取适量于95%乙醇溶液中浸泡使其充分溶胀,滤去乙醇,用蒸馏水洗涤至无醇味。将树脂依次用5%盐酸溶液和5%氢氧化钠溶液浸泡3 h(浸泡后均用蒸馏水洗涤至呈中性),处理完毕后浸没于蒸馏水中,4 ℃保存备用。使用前抽滤至质量不变,准确称取所需湿质量。

2.4.2 大孔树脂初步筛选

2.4.2.1 大孔树脂静态吸附能力测定 称取预处理后的大孔树脂各2 g，移至150 mL锥形瓶中，各加入50 mL总黄酮浓度为3.55 mg/mL的TFHC提取液，密封，置于恒温振荡器（25 ℃、120 r/min）中充分吸附24 h，滤过，取适量滤液测定总黄酮浓度，按公式计算吸附量和吸附率。

$$吸附量(mg/g)=\frac{(C_0-C_1)\times V_1}{W}。$$

$$吸附率(\%)=\frac{C_0-C_1}{C_0}\times 100\%。$$

式中C_0为样品液总黄酮原浓度（mg/mL），C_1为样品液吸附后总黄酮浓度（mg/mL），V_1为样品液体积（mL），W为树脂质量（g）。

2.4.2.2 大孔树脂静态解析能力测定 静态吸附后的6种大孔树脂经抽滤后加入30 mL 70%乙醇溶液，密封，置于恒温振荡器（25 ℃、120 r/min）中充分解析24 h，静置待树脂沉降，取适量上层解析液测定总黄酮浓度，按公式计算解析量和解析率。

$$解析量(mg/g)=\frac{C_2\times V_2}{W}。$$

$$解析率(\%)=\frac{C_2\times V_2}{(C_0-C_1)\times V_1}\times 100\%。$$

式中C_2为解析液总黄酮浓度（mg/mL），V_2为洗脱液体积（mL）。

2.4.3 大孔树脂动态纯化工艺考察

2.4.3.1 大孔树脂动态吸附条件考察 取活化后D-101大孔树脂适量，湿法装柱（1.5 cm×50 cm），分别考察上样浓度（0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL）、上样流速（1、2、3、4、5 mL/min）、径高比（1∶4、1∶8、1∶12、1∶16、1∶20）对吸附率的影响。通过动态吸附泄漏曲线（每10 mL收集流出液）确定最佳上样体积。所有实验均在室温（23.5 ℃）下进行。收集各阶段流出液，测定总黄酮浓度并计算吸附率，确定最佳动态吸附条件。

2.4.3.2 大孔树脂动态洗脱条件考察 在确定的最佳动态吸附条件基础上，系统优化洗脱工艺。取活化后D-101大孔树脂适量，湿法装柱（1.5 cm×50 cm），在固定上样条件（1.5 mg/mL TFHC提取液40 mL，2 mL/min，23.5 ℃）下，分别考察除杂用水量（每5 mL收集水洗液，测定总多糖含量）、洗脱剂类型（甲醇、乙醇、丙酮）、洗脱剂浓度（10%、30%、50%、70%、90%、100%）及洗脱流速（1、2、3、4、5 mL/min）对解吸率的影响。收集各阶段洗脱液，测定总黄酮浓度并计算解吸率。同时，通过动态洗脱曲线（前30 mL每5 mL、之后每10 mL收集洗脱液）确定最佳洗脱剂用量。

2.5 TFHC抗氧化活性评价

2.5.1 DPPH自由基清除实验 参照文献方法[15]并稍作修改，准确称取DPPH试剂，用95%乙醇配制成0.08 mg/mL的工作液，避光备用。将纯化前后的TFHC样品及抗坏血酸（阳性对照）分别配制成1 mg/mL的乙醇溶液。测定时，取2.5 mL DPPH工作液，分别加入0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL经预实验筛选的样品及对照液，以95%乙醇定容至5 mL，摇匀，避光反应后于516 nm测定吸光度A；另取等量样品溶液用95%乙醇定容至5 mL，测定吸光度A_1；取2.5 mL DPPH工作液定容至5 mL，测定吸光度A_0。该浓度与体积梯度设置旨在通过统一母液浓度与加样体积，确保阳性对照与样品半数抑制浓度（IC_{50}）数据的可比性；同时将TFHC的清除率控制在15%~75%的有效拟合区间，以准确评估其活性及纯化效果；且适配抗坏血酸强效特性，契合其阳性对照定位；据此按照公式计算DPPH自由基清除率。

$$DPPH清除率(\%)=1-\frac{A-A_1}{A_0}\times 100\%。$$

2.5.2 XOD抑制实验 花茵陈中黄酮类成分通过抑制XOD活性实现机制性抗氧化，参照文献方法[16]，通过测定XOD催化黄嘌呤生成尿酸的含量评价其活性。精密称取纯化前后的TFHC浸膏各1 g，用60%乙醇配制成20 mg/mL的TFHC母液，依次梯度稀释至20、16、12、8、4、2、1.5、1、0.5 mg/mL作为待测药液。按照“酶促反应体系”方法进行：于5 mL离心管中依次加入150 μL的0.04 U/mL XOD溶液、150 μL的待测药液，置于37 ℃中水浴5 min。加入450 μL的0.3 mmol/L黄嘌呤溶液以启动反应，再次37 ℃水浴40 min，加入100 μL的1 mol/L盐酸溶液终止反应，最后加入2.45 mL的磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.4），摇匀。

分别取150 μL磷酸缓冲液作为空白对照，150 μL别嘌呤醇作为阳性对照，同“酶促反应体系”方法反应。取适量终止后的各反应液，采用高效液相（HPLC）法测定尿酸色谱峰面积。每个样品平行测定3次。按照公式计算XOD抑制率。

$$XOD抑制率(\%)=\frac{A_0-A}{A_0}\times 100\%。$$

式中A_0为未加入抑制剂时的尿酸峰面积，A为

加入抑制剂后的尿酸峰面积。

2.6　数据处理　采用SPSSAU在线平台进行正交实验设计。采用Design-Expert 13.0进行响应面实验设计与分析。采用GraphPad Prism 9.0进行绘图。实验重复3次，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

3　结果与分析

3.1　单因素实验结果分析　乙醇体积分数对TFHC提取量的影响提示，随乙醇体积分数增大，TFHC提取量呈现先升后降趋势，并于40%乙醇体积分数时达到峰值[（58.99±0.87）mg/g]。此条件下溶剂极性与目标黄酮类成分最为接近，利于溶出；乙醇浓度过高或过低易因极性失配或杂质溶出增多导致提取量下降，故选择40%为适宜乙醇体积分数。液料比对TFHC提取量的影响表明，TFHC提取量在液料比为50 mL/g时最高，达到（89.54±1.05）mg/g。进一步增大液料比，TFHC提取量下降，可能因溶剂过量导致杂质溶出比例上升，故确定适宜液料比为50 mL/g。超声时间对TFHC提取量的影响显示，超声时间为20 min时，TFHC提取量最高，达到（88.00±0.22）mg/g。继续延长超声时间，提取量下降，可能因超声空化及热效应对黄酮结构造成破坏，故选择20 min为较佳超声时间。热浸时间对TFHC提取量的影响提示，热浸时间为1 h时，TFHC提取量达最大值（88.80±1.17）mg/g，延长热浸时间并未显著提升TFHC提取量，表明1 h已经基本实现充分提取，故确定1 h为适宜热浸时间。热浸温度对TFHC提取量的影响显示，热浸温度为70 ℃时，TFHC提取量最高，为（90.24±1.18）mg/g。温度继续升高至80 ℃后提取量显著下降，可能因高温导致黄酮类成分分解或溶剂挥发，故选取70 ℃作为适宜热浸温度。见图1。

综上所述，通过单因素实验确定的最佳提取条件为：乙醇体积分数40%、液料比50 mL/g、超声时间20 min、热浸时间1 h及热浸温度70 ℃。

3.2　正交实验结果分析　根据单因素实验结果，继续考察优化TFHC提取工艺，正交实验设计及结果见表3。结果表明，各因素的最佳水平组合为$A_2B_2C_3D_2E_3$，即乙醇体积分数40%、液料比50 mL/g、超声时间30 min、热浸时间1 h、热浸温度70 ℃。各因素对TFHC提取量的影响顺序为：液料比>热浸时间>乙醇体积分数>超声时间>热浸温度。

3.3　响应面实验结果分析

3.3.1　响应面设计与结果　根据正交实验结果，采用Box-Behnken响应面法，以液料比、乙醇体积分数及热浸时间3个因素及其水平共进行17组实验，分别测定TFHC提取量。实验设计及结果见表4及表5。

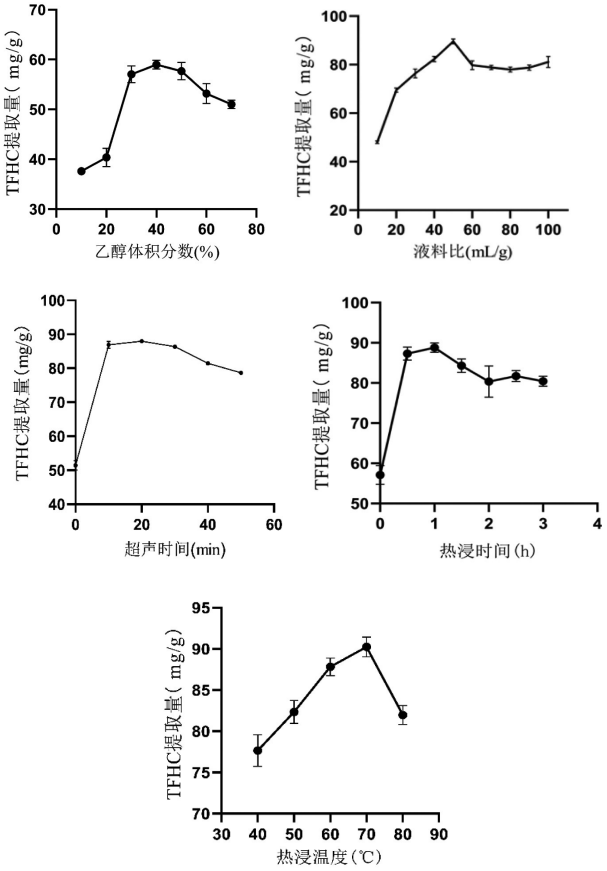

图1　乙醇体积分数、液料比、超声时间、热浸时间、热浸温度对TFHC提取量的影响（$\bar{x}\pm s$）

3.3.2　模型建立与分析　采用Design-Expert 13.0数据分析软件对实验数据进行多元回归拟合，回归模型系数及显著性检验结果见表5。二次多项回归模型为：$Y=99.55+1.43A-3.65B+1.63C+4.16AB+0.91AC+1.67BC-4.12A^2-8.28B^2-5.55C^2$。如表5所示，本研究模型$P$小于0.000 1，失拟项$P$为0.732 0，$R^2$为0.982 9，$R_{adj}^2$为0.961 0，证明该模型可靠且拟合度良好。3个因素对TFHC提取量影响的重要程度为$B>C>A$，即乙醇体积分数>热浸时间>液料比。A、C、BC对总黄酮含量的影响显著（$P<0.05$）。B、AB、A^2、C^2、B^2对总黄酮含量的影响显著（$P<0.01$）。

3.3.3　各因素交互作用　等高线与曲面图可以反映因素之间的交互作用，图形表现得越陡峭表明两者之间的交互作用越显著。液料比（A）、乙醇体积分数（B）、热浸时间（C）对总黄酮含量的影响见图2、

表3 正交实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	E	TFHC提取量(mg/g)
1	1	1	1	1	1	78.41
2	1	1	2	2	3	85.70
3	1	2	1	3	3	88.06
4	1	2	3	1	2	79.99
5	1	3	2	3	2	69.09
6	1	3	3	2	1	82.26
7	2	1	1	3	2	89.20
8	2	1	3	1	3	90.58
9	2	2	2	2	2	94.65
10	2	2	3	3	1	89.63
11	2	3	1	2	3	83.25
12	2	3	2	1	1	73.83
13	3	1	2	3	1	84.26
14	3	1	3	2	2	92.82
15	3	2	1	2	1	92.13
16	3	2	2	1	3	83.50
17	3	3	1	1	2	82.39
18	3	3	3	3	3	85.83
K_1	80.58	86.83	85.57	81.45	83.42	
K_2	86.86	87.99	81.84	88.47	84.69	
K_3	86.82	79.44	86.85	84.34	86.15	
R	6.27	8.55	5.01	7.02	2.73	

表4 响应面优化总黄酮含量实验设计与结果

实验号	因素			
	液料比(A)(mL/g)	乙醇体积分数(B)(%)	热浸时间(C)(h)	TFHC提取量(W)(mg/g)
1	-1	-1	0	93.07
2	1	-1	0	87.88
3	-1	1	0	78.12
4	1	1	0	89.56
5	-1	0	-1	87.33
6	1	0	-1	88.09
7	-1	0	1	89.86
8	1	0	1	94.25
9	0	-1	-1	90.28
10	0	1	-1	78.99
11	0	-1	1	89.12
12	0	1	1	84.51
13	0	0	0	99.42
14	0	0	0	98.25
15	0	0	0	97.80
16	0	0	0	101.40
17	0	0	0	100.89

图3及图4。曲面图与表5方差分析的结果相符。

3.3.4 最佳工艺条件及验证 结合模型及回归方程，得到响应面最佳条件为：液料比50.951 mL/g、乙醇体积分数38.163%、热浸时间1.064 h。根据实验实际可操作性，将工艺参数优化为：液料比51 mL/g、乙醇体积分数38.2%、超声时间30 min、热浸温度70℃、热浸时间1.00 h。在此最优条件下经3次平行实验测得实际TFHC提取量为(101.26±1.354) mg/g，与预测值100.058 mg/g偏差较小，证明优化数据具有可行性，将该条件确定为最佳工艺条件。

表5 TFHC提取量模型及回归系数的回归分析结果

来源	离差平方和	自由度	均方	F	P	显著性
Model	768.33	9	85.37	44.77	<0.000 1	**
A	16.25	1	16.25	8.52	0.022 4	*
B	106.36	1	106.36	55.78	0.000 1	**
C	21.29	1	21.29	11.16	0.012 4	*
AB	69.14	1	69.14	36.26	0.000 5	**
AC	3.29	1	3.29	1.73	0.230 1	
BC	11.16	1	11.16	5.85	0.046 2	*
A^2	71.42	1	71.42	37.46	0.000 5	**
B^2	288.39	1	288.39	151.25	<0.000 1	**
C^2	129.74	1	129.74	68.04	<0.000 1	**
残差	13.35	7	1.91			
失拟项	3.36	3	1.12	0.45	0.732 0	ns
纯误差	9.99	4	2.50			
总和	781.68	16				
R^2=0.982 9，R^2_{adj}=0.961 0，R^2_{pre}=0.911 3						

注：**表示P<0.01，*表示P<0.05，ns表示P>0.05。

3.4 TFHC纯化结果

3.4.1 大孔树脂初步筛选结果 6种不同型号大孔树脂中，AB-8、D-101树脂吸附率及吸附量较大且两者差异无统计学意义(P>0.05)；NKA-9和D-101树脂的解析率较大且两者差异无统计学意义(P>0.05)；解析量最大的树脂是D-101，其次为AB-8，两者差异具有统计学意义(P<0.05)。综上所述，本实验中D-101树脂在吸附和解析两方面均具有优良表现，故选择D-101树脂进行后续研究。见表6。

3.4.2 动态吸附条件优化结果 1)上样浓度对TFHC吸附率的影响。随着上样浓度增加，吸附率呈逐渐上升趋势，上样浓度为1.5 mg/mL时吸附率最大，为(97.00±0.27)%。因此，选择1.5 mg/mL作为适宜上样浓度。见表7。

2)上样流速对TFHC吸附率的影响。吸附率随上样流速增加而降低，流速为1 mL/min时吸附率最大，为(97.07±0.16)%。结合工艺效率及实际情况，

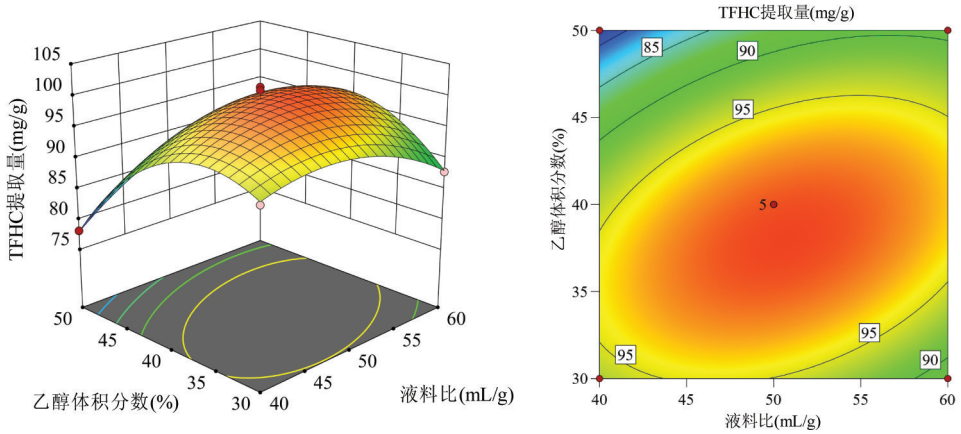

图2　液料比与乙醇体积分数交互作用对TFHC提取量的响应面及等高线

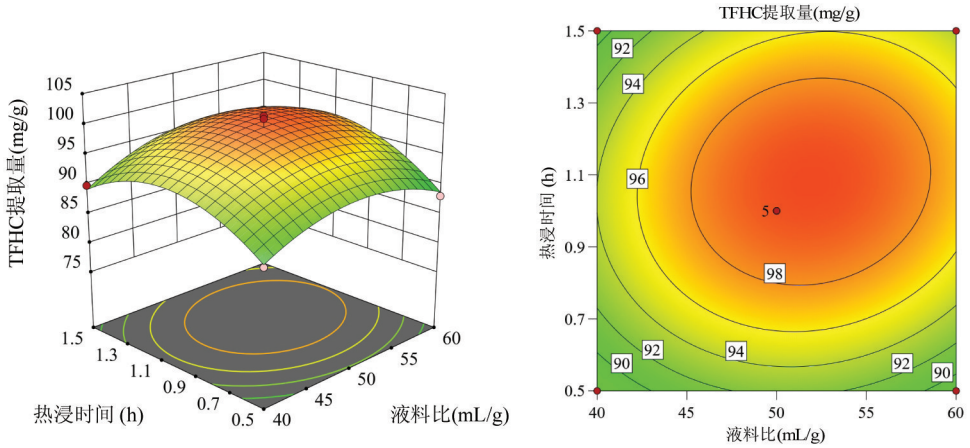

图3　液料比与热浸时间交互作用对TFHC提取量的响应面及等高线

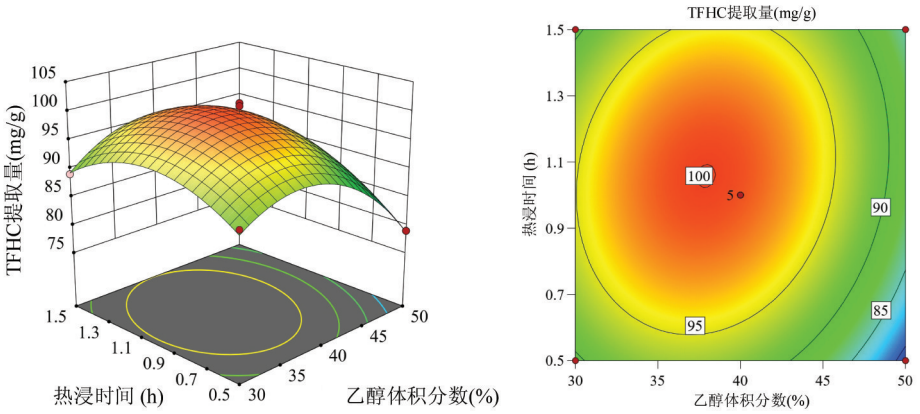

图4　乙醇体积分数与热浸时间交互作用对TFHC提取量的响应面及等高线

流速为1 mL/min和2 mL/min时吸附率相差较小，故选择2 mL/min作为适宜上样流速。见表8。

3）树脂柱径高比对TFHC吸附率的影响。吸附率整体表现为先上升后趋于平稳，径高比为1∶12时吸附率最大，为（95.07±0.03）%。考虑树脂用量及重复使用、装柱时的便捷性，本研究选择1∶12作为适宜径高比。见表9。

4）上样体积对TFHC吸附效果的影响。随着上样体积增加，流出液中总黄酮浓度逐渐升高，表明其在被树脂吸附的同时也相应有所泄漏。参照文献方法，将流出液总黄酮浓度达到上样液浓度1/10时判定为泄漏点[17]，此时应停止上样。本实验中，上样体积在10~30 mL，流出液浓度持续上升；当上样体积为40 mL时，浓度达到0.17 mg/mL，已经达到泄漏点，故选择40 mL作为适宜上样体积。见图5。

3.4.3　动态解析条件优化结果　1）除杂洗脱剂用

表6 大孔树脂初步筛选结果($\bar{x}\pm s$)

树脂类型	n	吸附率(%)	吸附量(mg/g)	解析率(%)	解析量(mg/g)
AB-8	3	46.70±0.42*	41.45±0.38*	83.01±2.15△	68.80±1.17#
D-4020	3	39.41±0.25#	34.98±0.22#	88.83±1.02#	62.14±0.37△
D-101	3	45.93±0.45*	40.76±0.40*	91.53±0.88*#	74.62±0.75*
NKA-9	3	37.58±0.69△	33.35±0.62△	94.48±2.36*	63.01±0.74△
HPD-600	3	39.40±0.50#	34.97±0.50#	89.20±2.12#	62.37±0.72△
DM-130	3	34.03±0.55▲	30.20±0.49▲	89.06±2.31#	53.77±0.70▲

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

表7 上样浓度对TFHC吸附率的影响($\bar{x}\pm s$) %

上样浓度(mg/mL)	n	吸附率
0.25	3	95.83±0.52△
0.50	3	96.98±0.21*
1.00	3	96.46±0.28#
1.50	3	97.00±0.27*
2.00	3	96.42±0.12#
2.50	3	95.35±0.06△

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

表8 上样流速对TFHC吸附率的影响($\bar{x}\pm s$) %

上样流速(mL/min)	n	吸附率
1	3	97.07±0.16*
2	3	96.24±0.08#
3	3	91.81±0.12△
4	3	90.25±0.10▲
5	3	86.24±0.12**

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

表9 径高比对TFHC吸附率的影响($\bar{x}\pm s$) %

径高比	n	吸附率
1∶4	3	63.75±0.05**
1∶8	3	88.50±0.09▲
1∶12	3	95.07±0.03*
1∶16	3	94.01±0.07△
1∶20	3	94.33±0.04#

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

量。上样完成后,对大孔树脂柱进行水洗以去除水溶性杂质。参考文献方法[18],采用蒽酮-浓硫酸法测定总多糖含量,绘制标准曲线,得到回归方程为Y=0.016 24X+0.000 998 9(R^2=0.999 5)。通过测定不同体积蒸馏水洗脱液中的总多糖含量评估除杂

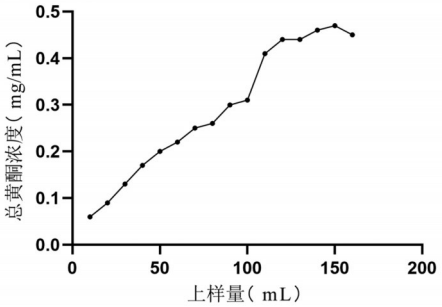

图5 TFHC动态泄漏曲线

效果。随着蒸馏水用量增加,水洗液多糖含量逐渐下降;当用量达到60 mL后,其含量趋于稳定并接近零。此时流出液无色透明,表明杂质已经基本除尽。因此,最终确定60 mL为最佳除杂洗脱剂用量。见图6。

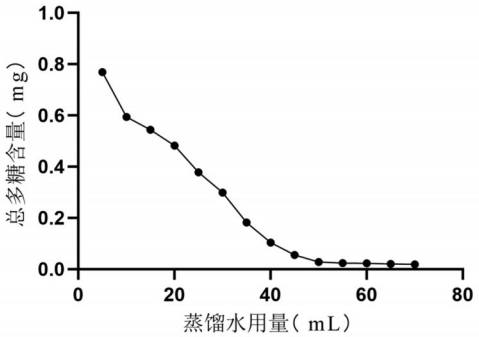

图6 除杂洗脱曲线

2)洗脱剂类型。上样及除杂完成后,选用甲醇、乙醇及丙酮3种常用洗脱剂,在洗脱流速、洗脱液用量及洗脱剂浓度固定条件下,初步考察3者的洗脱能力,见表10。由结果可知,洗脱能力丙酮>乙醇>甲醇。

表10 不同洗脱剂对TFHC解析率的影响($\bar{x}\pm s$) %

洗脱剂类型	n	解析率
甲醇	3	71.42±0.47△
乙醇	3	75.87±0.36#
丙酮	3	86.19±0.40*

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

3)洗脱剂及其浓度。在洗脱流速和洗脱液用量固定时,考察不同浓度丙酮和乙醇对TFHC的洗脱能力,结果见表11。由结果可知,丙酮对TFHC的洗脱能力随浓度增大而增强;乙醇对TFHC的洗脱能力随浓度增大先增强后减弱。综合来看,70%乙醇和100%丙酮的解析率相当,考虑试剂的易得性与安全性,选择70%乙醇作为适宜洗脱剂。

表11 洗脱剂及其浓度对TFHC解析率的影响($\bar{x}\pm s$) %

浓度(%)	n	不同洗脱剂的解析率	
		乙醇	丙酮
10	3	38.97±0.44△△△	39.37±0.97△△△
30	3	53.71±0.26▲▲	48.58±0.74###
50	3	68.43±0.34△△	52.00±0.59***
70	3	82.73±0.13#	70.72±1.03##
90	3	78.05±0.29▲	80.01±0.72△
100	3	76.72±0.01**	85.94±0.26*

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

4)洗脱剂流速。当洗脱剂浓度和体积固定时,考察洗脱液流速对TFHC洗脱效果的影响,结果见表12。随着洗脱流速加快,解析率呈下降趋势。洗脱液流速加快时,其与树脂接触时间缩短,树脂柱的总黄酮未能及时转移至洗脱液,导致解析率下降。综合考虑洗脱效果与时间成本,本研究将洗脱流速定为3 mL/min。

表12 洗脱流速对TFHC解析率的影响($\bar{x}\pm s$) %

洗脱流速(mL/min)	n	解析率
1	3	86.27±1.31*
2	3	82.72±0.37#
3	3	81.13±0.38△
4	3	79.35±0.22▲
5	3	75.92±0.91**

注:同列数据右上方标注不同符号表示组间比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

5)洗脱剂用量。固定洗脱剂种类与洗脱流速,考察洗脱液用量对TFHC洗脱效果的影响。洗脱液用量越多洗脱越充分,当用量达到40 mL时,洗脱液中的总黄酮浓度已经基本趋近于零,见图7。综合洗脱效率与节约试剂,本研究确定60 mL为适宜洗脱剂用量。

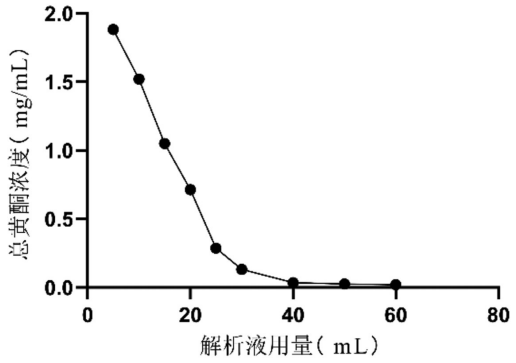

图7 TFHC动态洗脱曲线

综上所述,结合实际树脂柱规格(1.5 cm×50 cm)及用量优化关键参数,确定最佳纯化工艺,以适应后续实验与工业化生产需求:上样浓度1.5 mg/mL,上样流速7 BV/h,树脂柱径高比1∶12,上样量2.35 BV,除杂洗脱液用量2.94 BV,洗脱剂选用70%乙醇,洗脱流速10.6 BV/h,洗脱剂用量2.35 BV。

3.4.4 纯化工艺验证 按照上述最佳纯化工艺条件进行3组平行实验,纯化工艺验证结果见表13。总黄酮纯度由粗品的(38.33±1.44)%提升至(92.00±0.78)%,纯化前后RSD分别为3.76%和0.85%。结果表明,花茵陈醇提液经过该工艺纯化后,总黄酮纯度明显升高,且重复性较好。

表13 TFHC纯化工艺验证结果 %

编号及RSD	吸附率	解析率	上样液纯度	解析液纯度
A	94.56	80.59	37.50	91.35
B	94.81	80.98	37.50	92.86
C	94.50	81.59	40.00	91.78
RSD	0.18	0.62	3.76	0.85

3.5 TFHC抗氧化活性评价 DPPH自由基清除实验中,纯化后TFHC的IC_{50}值较纯化前降低了52.85%,表明其抗氧化能力显著提升;阳性对照抗坏血酸的IC_{50}值显著低于纯化后TFHC,进一步验证了其作为强效阳性对照的合理性。XOD抑制实验中,TFHC纯化后的IC_{50}值较纯化前降低62.36%,说明其对XOD的抑制能力显著提升,见表14、表15。以上结果表明,优化所得的纯化工艺能够显著增强TFHC的抗氧化能力及XOD抑制能力。

表14 TFHC纯化前后DPPH自由基清除能力

组别	浓度(mg/mL)	抑制率($\bar{x}\pm s$,%)	IC_{50}(mg/mL)
TFHC纯化前浸膏	0.10	66.33±0.95	0.070
	0.08	52.32±0.71	
	0.06	41.59±0.78	
	0.04	30.49±0.87	
	0.02	18.84±1.64	
TFHC纯化后浸膏	0.10	84.87±1.63	0.033
	0.08	74.96±0.99	
	0.06	64.84±1.07	
	0.04	50.87±0.76	
	0.02	38.25±0.73	
抗坏血酸	0.10	94.64±0.59	1.558×10^{-3}
	0.08	94.65±0.52	
	0.06	93.41±0.33	
	0.04	91.97±0.35	
	0.02	76.38±0.4	

表15 TFHC纯化前后的XOD抑制能力

组别	浓度(mg/mL)	抑制率($\bar{x}\pm s$,%)	IC_{50}(mg/mL)
TFHC纯化前浸膏	20.0	86.35±0.38	5.061
	16.0	75.34±0.81	
	12.0	64.56±1.00	
	8.0	52.71±0.76	
	4.0	42.58±1.10	
	2.0	33.24±1.27	
	1.5	24.15±0.26	
	1.0	21.14±1.03	
	0.5	16.01±0.95	
TFHC纯化后浸膏	20.0	93.93±0.18	1.905
	16.0	86.80±0.04	
	12.0	76.45±0.15	
	8.0	68.74±0.56	
	4.0	60.00±0.92	
	2.0	53.46±0.50	
	1.5	50.80±0.97	
	1.0	39.08±0.90	
	0.5	21.92±0.30	
别嘌呤醇	11.84×10^{-3}	67.47±0.77	4.364×10^{-3}
	10.36×10^{-3}	54.56±0.96	
	7.40×10^{-3}	50.12±1.13	
	4.44×10^{-3}	34.76±1.47	
	2.96×10^{-3}	4.60±0.61	
	1.48×10^{-3}	3.11±0.14	
	0.74×10^{-3}	1.70±0.29	

4 讨论

黄酮类化合物是天然植物发挥药效作用的重要有效成分之一，在抗氧化、抗肿瘤等方面具有显著量效关系[19]。本研究结果表明，热浸辅助超声提取可以显著提高TFHC得率，反映出复合传质强化策略在有效成分释放与扩散促进方面的有效潜力。在工艺参数确定与协同优化过程中，单因素实验显示最优超声时间为20 min，该结果仅反映超声时间的独立主效应；而在多因素耦合体系中，超声时间需要与液料比、乙醇体积分数等关键参数协同匹配，交互作用可能引起最优水平迁移，故综合优化后将超声时间确定为30 min，以获得更加稳定的联合提取效能。进一步对比不同优化方法结果，可见正交实验与响应面分析对影响因素的主次排序存在差异（正交实验：液料比>热浸时间>乙醇体积分数>超声时间>热浸温度；响应面分析：乙醇体积分数>热浸时间>液料比），该差异反映出筛选型设计（正交实验）结果可能受次要因素（超声时间与热浸温度）交互效应的干扰，而二次模型拟合（响应面分析）有利于更清晰地揭示核心工艺参数的独立影响与交互关系。基于优化所得的最佳提取工艺开展验证实验，TFHC提取量为（101.26±1.354）mg/g，与理论预测一致，表明该工艺具有良好的重复性。

在TFHC的富集与纯化环节中，非极性D-101树脂表现出较优的吸附及解析性能，结合已经报道的茵陈黄酮成分谱[20]，表明D-101树脂的吸附及解析特性与茵陈黄酮组分的极性分布具有一致性，因而对目标成分具有较好的选择性富集优势。在最佳提取与纯化条件下，TFHC纯度提高53.35%，DPPH自由基清除能力与XOD抑制能力分别提高52.85%和62.36%，表明纯化富集在提升目标成分富集程度的同时，实现了体外抗氧化活性的同步增强。纯化后的TFHC可能展现出双重抗氧化机制：在直接清除自由基的同时，又通过调控氧化酶途径发挥机制性抗氧化作用，这与已知的黄酮类成分的XOD抑制机制相符[16]。基于上述工艺优化与活性验证结果，可以将乙醇体积分数、热浸时间与液料比确定为关键工艺参数进行过程控制，并以得率、纯度及抗氧化活性作为核心质量评价指标，从而为TFHC工艺的可重复性制备及后续药效研究提供依据。

综上所述，本研究通过对TFHC的提取纯化方法进行优化，建立了最佳工艺条件，方法可行且重复性好，所得产物在体外实验中表现出较强的抗氧化能力，可以为TFHC的产业化制备与药理应用研究提供实验依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：250.
[2] 刘玉萍，邱小玉，刘烨，等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药，2019，50(9)：2235-2241.
[3] WEI W L，WANG W J，CHEN H，et al. A promising Artemisia capillaris Thunb. leaf proteins with high nutrition，applicable function and excellent antioxidant activity[J]. Food Chemistry：X，2024，21：101153.
[4] 陈志娜，叶韬，刘梦肴，等. 茵陈蒿不同溶剂提取物体外抗氧化活性分析[J]. 食品科技，2019，44(7)：262-266.
[5] 何琦，张乃曼，王雪媛，等. 不同采收时间茵陈药材HPLC指纹图谱研究[J]. 辽宁中医药大学学报，2024，26(9)：42-50.
[6] 陶玉杰. 绵茵陈与花茵陈的现代药理对比及临床应用[J]. 中国现代药物应用，2017，11(19)：193-194.
[7] 王璐瑶，李余佳，李传娟，等. UFLC-Q-TOF-MS/MS结合HPLC-DAD多成分定量对不同生长期滨蒿的质量评

价[J]. 中草药,2024,55(23):8185-8196.
[8] 徐名慧,苏红彦,邬国栋,等.不同采收期茵陈主要活性物质含量及抗氧化能力变化[J]. 中草药,2025,56(17):6355-6361.
[9] 刘江波.大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的规律性研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.
[10] 王竞红,王非,杨成武,等.大孔吸附树脂分离纯化紫穗槐叶类黄酮的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2016,36(1):112-118.
[11] 郭文娟,王娜娜,代昭,等.茵陈总黄酮的提取及富集工艺[J]. 天津工业大学学报,2016,35(5):37-41.
[12] 陈凌利,韦雯璐,李建明,等.茵陈蒿黄酮的提取、化学组成及生物活性研究进展[J]. 江西农业大学学报,2024,46(2):263-277.
[13] 杨丽霞,黄海华,郭维婷,等.正交试验结合响应曲面法优化辣椒红色素的提取工艺[J]. 包装与食品机械,2024,42(1):7-11,18.
[14] 云秀伟.野生茵陈引种实验及质量评价研究[D]. 天津:天津中医药大学,2023.
[15] 徐祥浩,王莹,庞青云,等.大孔树脂富集大花红景天总黄酮及抗氧化活性研究[J]. 特产研究,2024,46(2):103-109,114.
[16] 任平国,任逸飞,徐启红,等.刺梨黄酮提取工艺优化及抑制黄嘌呤氧化酶活性研究[J]. 食品科技,2025,50(3):199-206.
[17] 杜国军,洪婉婷,李占锋,等.大孔树脂吸附法纯化酸枣仁总黄酮的工艺研究[J]. 中国调味品,2024,49(1):100-106.
[18] 张清华,陈玲芳,郭小藤,等.黄蜀葵花药材总多糖含量测定方法研究[J]. 山东化工,2024,53(18):136-138.
[19] DE BOSCH B J, KLUTH O, FUJIWARA H, et al. Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9[J]. Nature Communications, 2014,5:4642.
[20] NI C, LI X, WANG L, et al. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism[J]. Food & Function, 2021, 12(15):7054-7067.

(收稿日期:2026-02-26)
(本文编辑:高树明)

Optimization of the extraction and purification process for total flavonoids from *Artemisia capillaris* Thunb. (flowering stage) and investigation of their antioxidant efficacy

LIU Mingzhu[1], WANG Xueyuan[2], TAN Weihao[1], SUN Lufu[1], ZHANG Naijiao[2], LI Tianxiang[1]
(*1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. Shengshi Baicao Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300301, China*)

Abstract: [Objective] To optimize the extraction and purification process of total flavonoids from *Artemisia capillaris* Thunb. (flowering stage) (TFHC) and evaluate their *in vitro* antioxidant activity, providing an experimental basis for the industrial preparation and pharmacological application of TFHC. **[Methods]** The extraction process of TFHC was optimized by ultrasound-assisted hot maceration combined with orthogonal experiment and response surface methodology. Six macroporous resins (NKA-9, HPD-600, AB-8, DM-130, D-101, D-4020) were screened for dynamic purification to obtain refined TFHC. High-performance liquid chromatography (HPLC) and UV spectrophotometry were used to systematically evaluate the DPPH radical scavenging capacity and xanthine oxidase (XOD) inhibitory activity of the purified product. **[Results]** The optimal extraction parameters were determined as follows: liquid-to-solid ratio of 51 mL/g, ethanol volume fraction of 38.2%, ultrasonication time of 30 min, hot maceration temperature of 70 ℃, and hot maceration time of 1 h. D-101 resin exhibited the best static adsorption and desorption capacity. The optimal purification process was: loading concentration of 1.5 mg/mL, loading flow rate of 7 BV/h, resin column diameter-to-height ratio of 1∶12, loading volume of 2.35 BV, impurity elution volume of 2.94 BV, eluent of 70% ethanol, elution flow rate of 10.6 BV/h, and eluent volume of 2.35 BV. After the optimal purification process, the purity of TFHC increased from 38.33% to 92.00%. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of purified TFHC against XOD decreased from 5.061 mg/mL to 1.905 mg/mL, and the IC_{50} for DPPH radical scavenging capacity decreased from 0.070 mg/mL to 0.033 mg/mL. **[Conclusion]** The optimized extraction and purification process significantly improved the yield and purity of TFHC. The purified product showed enhanced DPPH radical scavenging capacity and XOD inhibitory activity, demonstrating potent antioxidant activity.

Keywords: *Artemisia capillaris* Thunb.; total flavonoids; macroporous resin; xanthine oxidase; antioxidant activity